ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 25 : 299—304 (2534)

การชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดต้นใหม่ของหวายตะค้าทอง โดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Callus Induction and Plant Regeneration of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) through Tissue Culture

พรชัย จุฑามาศ[1] ปรานอม พฤฒพงษ์[2] อิศรา วงศ์ข้าหลวง[2]
สุรียา ตันติวิวัฒน์[1] มนุวดี ง้าวสุวรรณ[1] ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์[1]
Pornchai Chuthamas, Pranom Prutpongse, Isara Vongkaluang,
Sureeya Tantiwiwat, Manuwadee Ngaosuwan, Piyarat Parinyapong

ABSTRACT

Tissue culture techniques for propagating and conservating of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) has been carried out at the Royal Chitralada Projects and Department of Horticulture, Kasetsart University. Attempts have been made to induce callus and plant regeneration from immature embryo of Wai Takra Thong. The immature embryos were cultured on the MS (Murashige and Skoog, 1962) medium to obtain clean culture of explants. Cut the explants into thin pieces and culture on MS, Y3 (Eeuwens, 1976) and WPM (Lloyd McCown, 1981) media additional with various concentrations of 2,4-D and BAP in plastic well plate. The culture on both MS media with 0.5 mg/12, 4-D + 2 mg/1 BAP and 0.1 mg/1 2, 4-D + 4 mg/1 BAP produced callus and multiplication. Shoot and root formation appeared on the same media.

บทคัดย่อ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์ของหวายตะค้าทองได้มีการดำเนินการที่โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา และภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการทดลองใช้คัพภะจากผลอ่อนของหวายตะค้าทอง นำมาเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) คัพภะที่ปลอดเชื้อนำไปตัดเป็นชิ้นบาง ๆ เลี้ยงบนอาหาร MS, Y3 (Eeuwens, 1976) และ WPM (Lloyd and McCown, 1981) ที่มี 2, 4-D และ BAP ระดับต่าง ๆ กันในจานหลุมพลาสติก เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ปรากฏว่าการเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 2, 4-D 0.5 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP 2 มก./ลิตร และ 2, 4-D 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP 4 มก./ลิตร เกิดแคลลัสได้ดี แคลลัสที่ได้เมื่อนำไปเลี้ยงต่อในขวดสามารถที่จะพัฒนาเป็นยอดและเพิ่มปริมาณ อีกทั้งสามารถที่จะเกิดรากในอาหารสูตรเดียวกันนี้

คำนำ

หวายเป็นปาล์มเลื้อยที่เรานำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่อุปกรณ์ประกอบอาชีพ เครื่องใช้ในครัวเรือน หวายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ การผลิตเฟอร์นิเจอร์หวายก่อให้เกิดการสร้างงาน

[1] โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา
The Royal Chitralada Projects
[2] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

ในชนบท นอกจากนี้เฟอร์นิเจอร์หวายเป็นการค้าภายในประเทศแล้วยังส่งเป็นสินค้าออกไปต่างประเทศปีละมาก ๆ ในปี 2520 มีมูลค่าส่งออก 23.3 ล้านบาท และเพิ่มขึ้นเป็น 440 ล้านบาทในปี 2528 และในปี 2530 มีมูลค่าส่งออกถึง 600 ล้านบาท การเพิ่มปริมาณการผลิตอย่างรวดเร็ว และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จึงทำให้วัตถุดิบหวายซึ่งทั้งหมดได้จากป่าธรรมชาติ ปัจจุบันเกิดการภาวะขาดแคลนเส้นหวายจนต้องมีการสั่งเข้าจากต่างประเทศ การปลูกหวายจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนเพื่อรองรับการขาดแคลนหวายที่จะมีขึ้นในอนาคตอันใกล้นี้ ในการศึกษาการขยายพันธุ์หวายที่มีค่าทางเศรษฐกิจบางชนิด ได้ดำเนินมาตั้งแต่ พ.ศ. 2529 มีการศึกษาการขยายพันธุ์หวายโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา โดยร่วมมือกับภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร และภาควิชาชีววิทยา ป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ขณะนี้ได้มีการทดลองปลูกหวายขึ้นหลายแห่งในประเทศไทย เช่น โครงการปลูกรวบรวมพันธุ์และศึกษาการเจริญเติบโตของหวายที่มีค่าทางเศรษฐกิจบางชนิดในพื้นที่สวนยาง ใกล้พระตำหนักเรือนต้น สวนจิตรลดา ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ และที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานฯ อ.เมือง จ.สกลนคร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเลี้ยงคัพภะจากผลอ่อนของหวายข้อดำ (Chuthamas *et al.*, 1989) แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาในการปลูกหวายที่ตามมาคือขาดแคลนเมล็ดและกล้า การศึกษาวิธีการขยายพันธุ์หวายให้ได้จำนวนมากและรวดเร็ว ได้ต้นกล้าที่สม่ำเสมอ จึงมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับหวายตะค้าทอง ซึ่งเป็นหวายพันธุ์หนึ่งที่มีความสำคัญใช้ในการจักสานทั่วไป ปัจจุบันเป็นของป่าหวงห้าม หาได้ยาก เนื่องจากมีการตัดมาใช้งานมากเมล็ดหายาก ควรที่จะทำการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วัตถุประสงค์ในการทดลองเพื่อที่ชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะ ชักนำให้เกิดยอดและรากของหวายตะค้าทองโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาเรื่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์และขยายพันธุ์หวายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ที่ได้รับทุนวิจัยจาก USAID/PSTC program

อุปกรณ์และวิธีการ

คัพภะจากผลอ่อนของหวายตะค้าทองถูกเลือกเป็นส่วนที่จะมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากคัพภะอยู่ในสภาพอ่อนวัยมีศักยภาพในการที่จะเจริญเป็นต้นและราก ผลอ่อนของหวายตะค้าทองถูกเก็บจากบริเวณป่าสงวนแห่งชาติ ไอสเตียร์ อ.ระแงะ จ.นราธิวาส นำมาศึกษาที่โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา และที่ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับผลหวายใช้ Sodium hypochlorite 2% นาน 30 นาที และสารละลาย Pen-strep (0.25 กรัม/น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 100 มล.) นาน 30 นาที จากนั้นนำมาล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แยกเปลือกที่หุ้มผลออกค่อย ๆ ใช้ปลายมีดผ่าตัดตัดหาตำแหน่งของคัพภะ เมื่อพบแล้วใช้ปลายมีดเขี่ยคัพภะ นำไปเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะ ทำโดยการนำเอาคัพภะ ที่ปลอดเชื้อตัดเป็นชิ้นบาง ๆ และนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS, Y3 (Eeuwens, 1976) และ WPM (Lloyd and Mccown, 1981) ที่มี 2, 4-D และ BAP ในระดับต่าง ๆ กันโดยมี 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, มก./ลิตร ในการเตรียมอาหาร จะแยกเตรียมในแต่ละสูตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.7 เติม Gelrite 2% เป็น gelling agent และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15 นาที เมื่อจะใช้นำอาหารมาหลอมใน water bath และใช้ไมโครไปเปตดูดอาหารใส่ลง

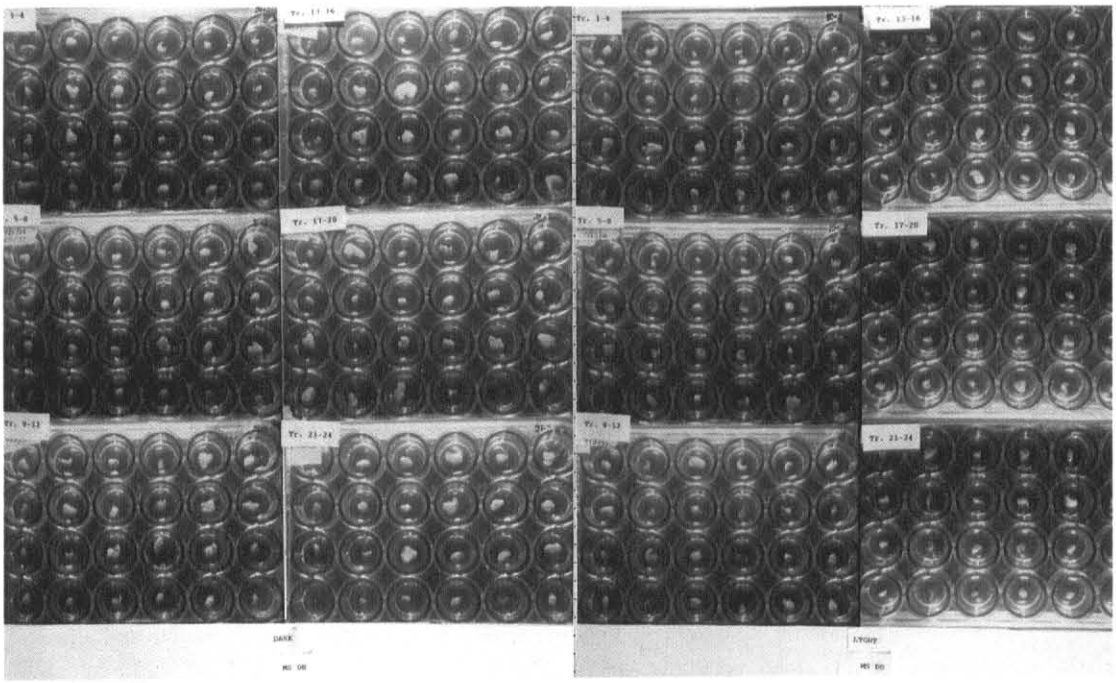

Figure 1 Callus induction of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) on MS media containing various concentrations of 2, 4-D and BAP under light and dark condition for 30 days.

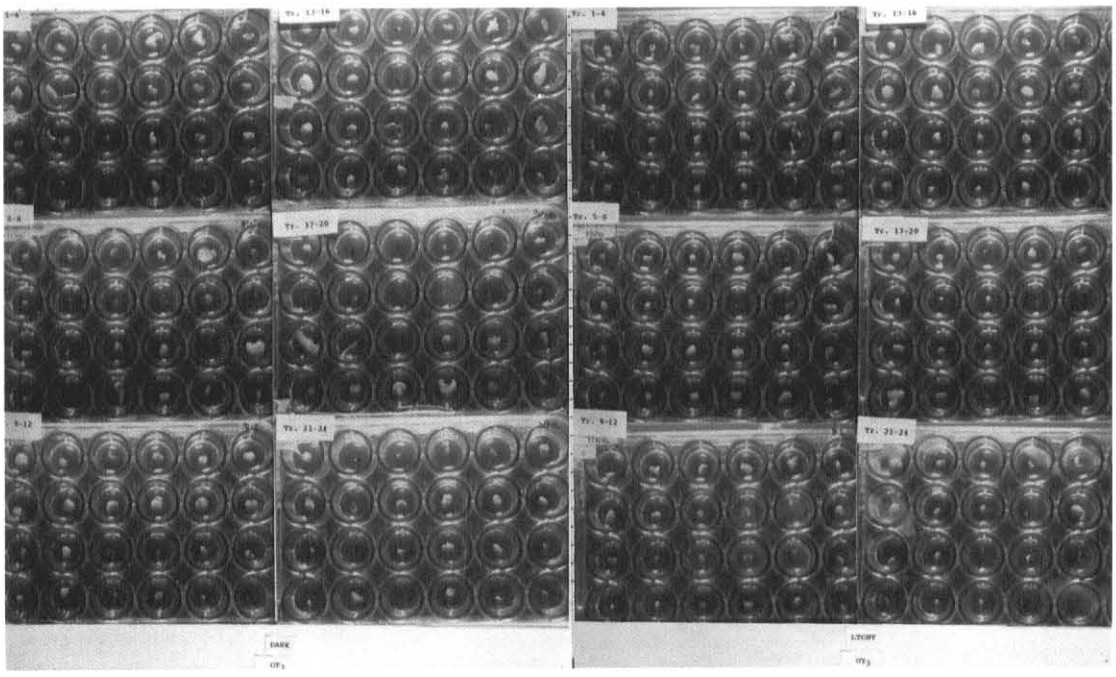

Figure 2 Callus induction of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) on Y3 media containing various concentrations of 2, 4-D and BAP under light and dark condition for 30 days.

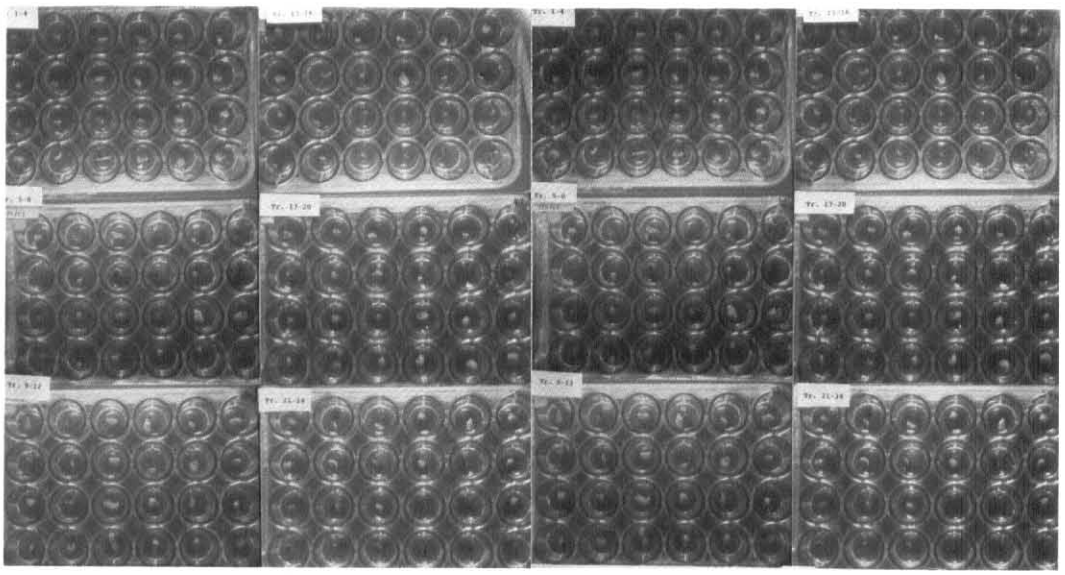

Figure 3 Callus induction of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) on WPM media containing various concentrations of 2, 4-D and BAP under light and dark condition for 30 days.

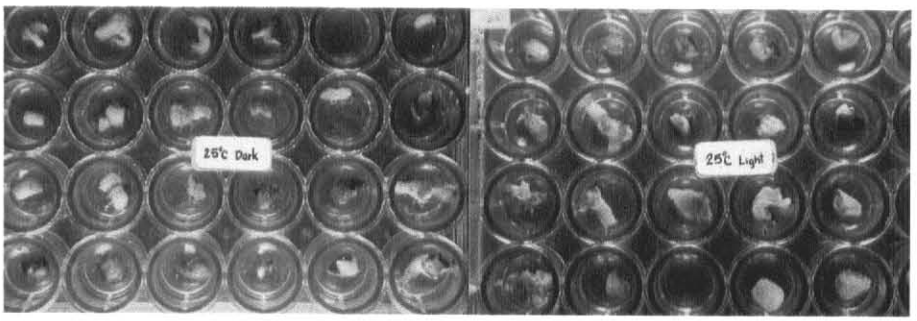

Figure 4 Callus of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) on MS media containing 0.5 mg/1 2, 4-D, 2 mg/1 BAP and 0.1 mg/1 2, 4-D, 4 mg/1 BAP under light and 24 hr. dark conditions.

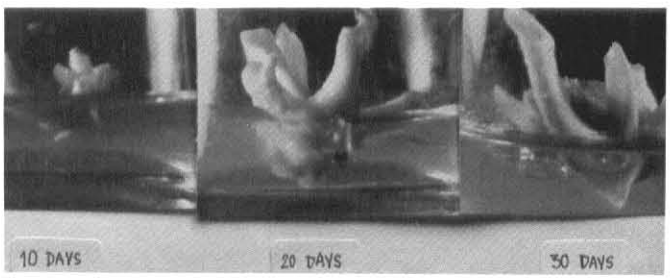

Figure 5 Embryogenesis of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume).

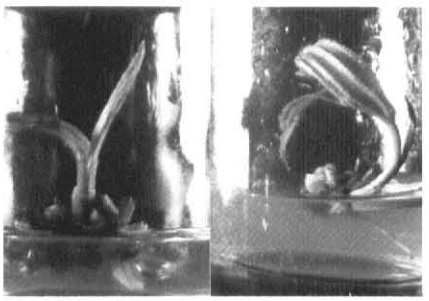

Figure 6 Shoot and root development from embryogenesis of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume).

ในหลุมของจานพลาสติก 24 หลุมที่มี 4 แถว ๆ ละ 6 หลุม ใส่อาหารหลุมละ 1 มล. แต่ละแถวเป็น 1 สูตรอาหาร โดยแต่ละอาหารมี 24 สูตร

ตัดคัพภะออกเป็นชิ้นบาง ๆ วางบนอาหารที่เตรียมไว้ในแต่ละหลุม ๆ ละ 1 ชิ้น การเตรียมอาหารและเลี้ยงคัพภะจะเตรียมเป็นสองชุด โดยนำชุดหนึ่งไปเลี้ยงบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25 ± 1° ซ. ที่มีแสง 16 ชม. มืด 8 ชม./วัน และอีกชุดหนึ่งนำไปเลี้ยงในที่มืด 24 ชม./วัน ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่เมื่อครบ 14, 21 และ 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตโดยให้เป็นคะแนน 4 = ดีมาก 3 = ดี 2 = พอใช้ 1 = ไม่ดี ทำการเฉลี่ยค่าการเจริญเติบโตในแต่ละ treatment เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส นำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 สัปดาห์ แล้วตัดแคลลัสที่ได้ออกเป็นชิ้นขนาด 3×3 มม. เลี้ยงบนอาหารที่ได้รับการคัดเลือกดังกล่าวข้างต้นเลี้ยงในสภาพมืด 24 ชม./วัน และที่สว่าง 16 ชม./วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 1° ซ.

ผลและวิจารณ์

จากผลการทดลอง การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อคัพภะของหวายตะค้าทองบนอาหาร MS, Y3 และ WPM ปรากฏว่า คัพภะที่เลี้ยงบนอาหาร MS ได้แคลลัสที่มีลักษณะดีที่สุด มีลักษณะแข็งสีขาวและใหญ่กว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร Y3 ซึ่งมีลักษณะใสค่อนข้างฉ่ำน้ำ ส่วนการเลี้ยงบนอาหาร WPM แคลลัสมีสีขาวแข็งแต่ไม่ค่อยโตแคระแกร็น (Table 1, Figure 1,2,3) การเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 2, 4-D 0.1-0.5 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP 2-4 มก./ลิตร จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี การเลี้ยงในที่มืดจะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่สว่าง (Figure 4)

สำหรับการศึกษาการพัฒนาของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ปรากฏว่าการเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มีปริมาณ 2, 4-D ต่ำตั้งแต่ 0.1-.05 มก./ลิตร และ BAP 2-4 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เกิด embryogenesis ค่อนข้างดี เช่นเดียวกันกับการทดลองชักนำให้เกิด embryogenesis ในปาล์มน้ำมัน (Paranjothy and Othman, 1982) ส่วนในอาหารที่มีปริมาณ 2, 4-D และ BAP สูงมีผลทำให้แคลลัสไม่เจริญและตายในที่สุด

การเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ที่มี 2, 4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 มก./ลิตร และ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP 4 มก./ลิตร จะเจริญเติบโตและเกิด embryogenesis การเลี้ยงในอาหารข้างต้น แคลลัสสามารถที่จะพัฒนาเป็นยอดและรากได้ภายใน 45 วัน (Figure 5, 6)

Table 1 Callus induction of Wai Takra Thong (*Calamus caesius* Blume.) on MS, Y3 and WPM with various concentration of 2, 4-D and BAP incubated under dark and light condition for 30 days.

Media	2,4-D mg/l	BAP mg/l	condition	average	result
MS	0–10	0–6	dark	2.50	well formation of cream hard callus
			light	2.38	well formation of white hard callus
Y3	0–10	0–6	dark	2.00	well formation of clear succulent callus
			light	1.96	formation of clear succulent callus
WPM	0–10	0–6	dark	1.79	formation of slow growth rate callus
			light	1.58	formation of slow growth rate callus

สรุป

ผลการทดลองการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อของคัพภะของหวายตะค้าทองบนอาหารชนิดต่าง ๆ กัน พบว่าการเลี้ยงบนอาหาร MS จะเกิดแคลลัสได้ดี มีลักษณะสมบูรณ์กว่าการเลี้ยงบนอาหาร Y3 และ WPM การเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 2, 4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 มก./ลิตร และ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 4 มก./ลิตร แคลลัสจะเจริญได้ดีที่สุด เมื่อทำการเลี้ยงต่อในขวดจะเพิ่มปริมาณสามารถพัฒนาเป็นยอดและรากในอาหารสูตรเดียวกันนี้

คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณ Division of Science and Technology USAID ประเทศไทย ที่ได้ให้ความสนับสนุนทุนวิจัย USAID/PSTC program และขอขอบคุณ คุณวิชิต โชติวีรชัยกุล นักวิชาการป่าไม้ สำนักงานป่าไม้เขตปัตตานี หัวหน้าสวนป่าหวายตามพระราชดำริ อ.สุคิริน จ.นราธิวาส ที่ได้ร่วมในการจัดหาพันธุ์หวาย

เอกสารอ้างอิง

Chuthamas P., P. Prutpongse, I. Vongkalung. and S. Tantiwiwat 1989. *In vitro* culture of immature embryos of *Calamus manan* Miq. In Recent Research on Rattans. Proc. of International Rattan Seminar, Faculty of Forestry, Kasetsart University 144-147 p.

Eeuwens,C.J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palm *(Cocos nucifera)* and culture *in vitro*. Phyiol. Plant 36. 23-28 p.

Lloyd, G. and B.H. McCown. 1981. Commercial-feasible micropropagation of mountain Lanrel, *Kalmia latifolia,* Linn. by use shoot tip culture. Proc. Intern. Plant Prop, Soc. 30 : 421-427 p.

Murashige, T and F. Skoog 1962. A revise medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15 : 473-497 p.

Paranjothy K., R. Othman. 1982. *In vitro* propagation of oil palm Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture 747-748 p.

Reynolds, J.F. and T. Murashige 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. In vitro. V.15, No. 5. 383-387 p.